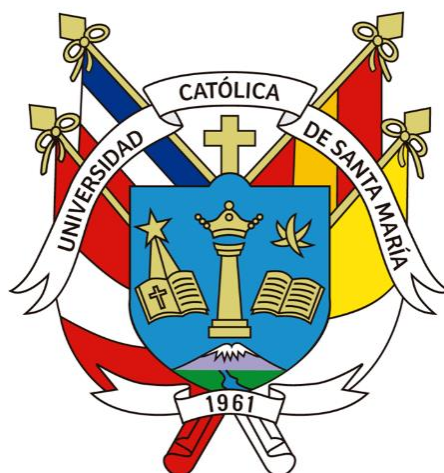




**Universidad Católica de Santa María**  
**Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas**  
**Escuela Profesional de Ingeniería Biotecnológica**



**DETERMINACIÓN DE LAS CONDICIONES DE CULTIVO,  
PRODUCCIÓN, EXTRACCIÓN Y ANÁLISIS DE ASTAXANTINA  
PRODUCIDA A PARTIR DE UNA CEPA NATIVA DE LA MICROALGA  
*Haematococcus lacustris*.**

Tesis presentada por la bachiller:

**Manrique Vera, Gabriela Isabel**

para optar el Título Profesional de:

**Ingeniera Biotecnóloga**

Asesor:

**Mgter. Paredes Zavala, Joshelyn**

**Arequipa – Perú**

**2019**

UNIVERSIDAD CATOLICA SANTA MARIA  
Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas  
y Biotecnológicas  
Escuela Profesional de Ingeniería Biotecnológica

Expediente N°. 20180000015270

N° Trámite en Fac. 379-2018

Fecha Recep. Fac. 26-03-2018

FORMATO UNICO PARA TRAMITACIÓN DE TÍTULO PROFESIONAL


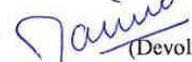
DE: **MANRIQUE VERA, Gabriela Isabel**

PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE INGENIERO BIOTECNOLOGO

**"EVALUACION DE LA ESTABILIDAD OXIDATIVA DE ACEITE VEGETAL REFINADO A TEMPERATURA DE FRITURA CON LA ADICION DE ASTAXANTINA OBTENIDA A PARTIR DE CULTIVO DE Haematococcus sp."**

DICTAMINADORES: **Ing. Cinthia Córdova Barrios** 2) **Mgter. Jaime Barreda del Carpio**

**DICTAMEN DE PLAN:** Señor Decano de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas, en atención a su designación, el Jurado Dictaminador del Plan de Tesis informa que: hechas las observaciones y subsanadas las correcciones; consideramos se encuentra APTO para continuar con el trámite de acuerdo al Reglamento de Grados y Títulos de la Facultad

Atentamente  
FIRMAS:   (Devolver antes de 8 días hábiles) FECHA **04/04/2018**

ASESOR: **Mgter. Joshelyn Paredes Zavala**

**DICTAMEN ASESORÍA:** Señor Decano de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas, en atención a su designación como asesora del trabajo de investigación presentado por las recurrentes, tengo a bien informar que luego de verificado el cumplimiento de los objetivos y la redacción del informe con los resultados, discusión y conclusiones correspondientes y debiendo cambiar el título a: **"DETERMINACION DE LAS CONDICIONES DE CULTIVO, PRODUCCION, EXTRACCION Y ANALISIS DE ASTAXANTINA PRODUCIDA A PARTIR DE UNA CEPA NATIVA DE LA MICROALGA Haematococcus lacustris"**, considero que el presente trabajo está APTO para continuar con el trámite, en conformidad al Reglamento de Grados y Títulos de nuestra Facultad

Atentamente  
FIRMA  FECHA **23/05/2019**

DICTAMINADORES BORRADOR DE TESIS:

- 1) **Ing. Cinthia Córdova Barrios** 3) **Mgter. Jaime Barreda del Carpio**  
2) **Dr. Fredy Molina Rodríguez**

**DICTAMEN FINAL:** Señor Decano de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas, atendiendo a su designación como Dictaminadores del presente Borrador de Tesis y luego de hechas las observaciones y correcciones pertinentes, cumpliendo con las exigencias mínimas establecidas para un trabajo de investigación de Tesis profesional, es que consideramos APTO para continuar con los trámites estipulados en el Reglamento de Grados y Títulos de la Facultad.

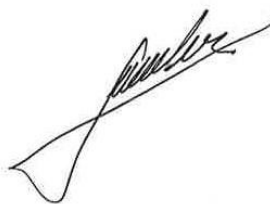
Atentamente  
FIRMA    (Devolver antes de 15 días hábiles) FECHA **07/08/2019**

JURADOS: PRESIDENTE **ING. CINTHIA CORDOVA BARRIOS**  
VOCAL **DR. FREDY MOLINA RODRIGUEZ**  
SECRETARIO **MAG. JAIME BARREDA DEL CARPIO**

FECHA **21/8/19** HORA **19.00** LOCAL **C-402**

FIRMA DEL DECANO

FECHA





*A mis padres Oscar y Carmen  
por su amor y apoyo incondicional,  
por creer en mí y motivarme a ser mejor.*



## AGRADECIMIENTOS

*A Dios, por todas las bendiciones y oportunidades que me da cada día.*

*A mis padres por darme la oportunidad de convertirme en quien soy ahora y por guiarme a lo largo de toda mi vida.*

*A toda mi familia por acompañarme y animarme a lograr todas mis metas y sueños.*

*A Toño por apoyarme en cada decisión, por toda su comprensión y cariño.*

*A todos mis amigos con quienes compartí una gran amistad, risas y amanecidas a lo largo de esta etapa.*

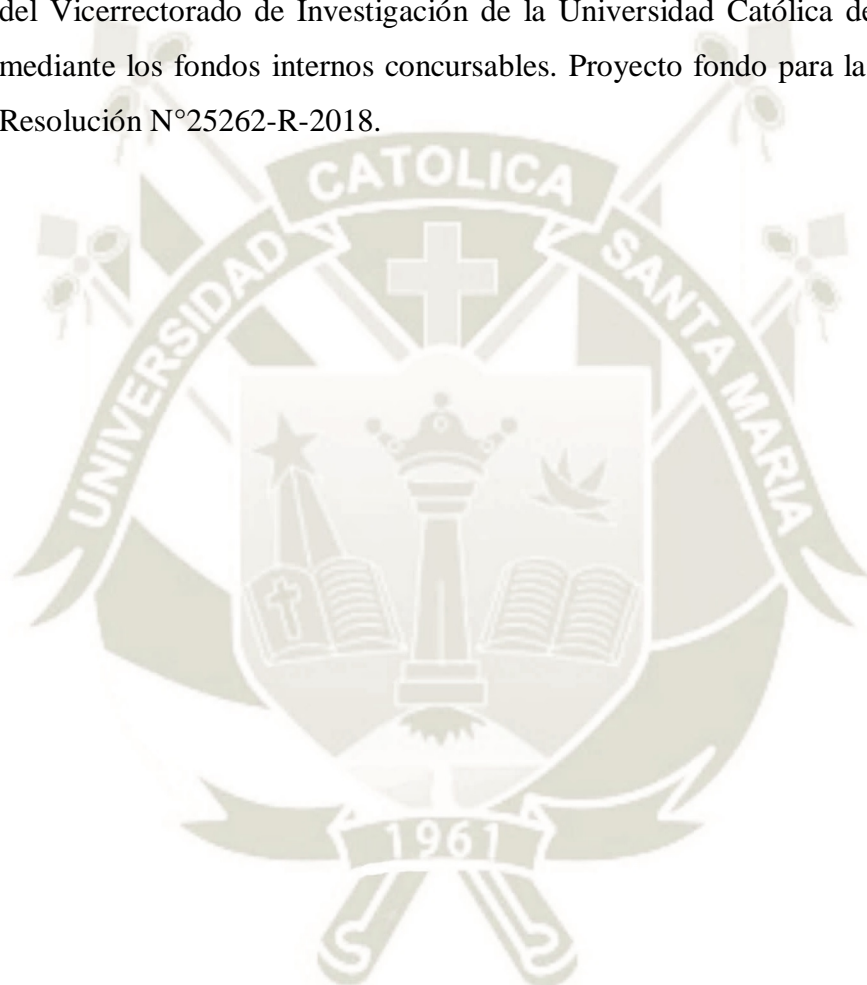
*A la Ing. Joshelyn Paredes por el gran ejemplo que es para mí, por la guía y motivación ofrecida durante todos mis años académicos.*

*Al Dr. Víctor Vásquez, a la ingeniera Nathalia Lopez y al ingeniero Edilberto Medina por todos sus consejos que fueron de gran ayuda en el desarrollo de esta tesis.*

*Al Dr. José Villanueva, a la maestra Jeaneth Medina y a los integrantes del laboratorio Proyecto Mercurio por su apoyo en el desarrollo experimental de esta tesis.*

*Al Vicerrectorado de Investigación de la Universidad Católica de Santa María por la subvención económica del proyecto bajo el cual se pudo desarrollar la presente tesis.*

Este proyecto de tesis se realizó como parte del *proyecto EVALUACIÓN DEL EFECTO FOTOPROTECTOR DE LA ASTAXANTINA COMERCIAL Y LA ASTAXANTINA EXTRAÍDA, PURIFICADA MEDIANTE EL MÉTODO DE FLUIDO SUPERCRÍTICO EN CÉLULAS EPITELIALES FRENTE A LA RADIACIÓN UVB Y UVA EN LA REGIÓN DE AREQUIPA*, con el financiamiento del Vicerrectorado de Investigación de la Universidad Católica de Santa María mediante los fondos internos concursables. Proyecto fondo para la Investigación Resolución N°25262-R-2018.



## INTRODUCCION

Las microalgas son microorganismos eucariotas fotosintéticos que se desarrollan en un medio acuático y utilizan la energía solar, nutrientes y dióxido de carbono para producir proteínas, carbohidratos, lípidos y demás compuestos orgánicos. Dichos compuesto sintetizados por las microalgas tienen diversas aplicaciones y comúnmente poseen alto valor e interés comercial para diversas industrias(1).

Astaxantina es un pigmento carotenoide de alto valor comercial por sus aplicaciones en la industria nutraceutica, farmacéutica y alimenticia (2,3). Esto se debe a que astaxantina presenta una alta actividad antioxidante que permite la eliminación de radicales libres, dicha actividad es superior a la actividad de otros conocidos antioxidantes como el  $\beta$ -caroteno y la Vitamina C (2). Adicionalmente se ha reportado que astaxantina mejora el sistema inmunológico(4), presenta efecto antitumoral(5)(6) y protege la piel de la fotooxidación causada por rayos UV(7).

Astaxantina se puede producir y extraer a partir de fuentes naturales como levaduras, subproductos de crustáceos y cultivo de microalgas. Esta última fuente es la más utilizada ya que las microalga del género *Haematococcus sp.* es conocida por ser una fuente rica para la obtención de astaxantina y en mayor concentración en comparación a otras fuentes naturales(8). El incremento de la demanda por la producción de astaxantina y sus altos precios en el mercado actual (\$2500–7000/kg), genera gran interés en el desarrollo e investigación de técnicas de cultivo eficientes con el fin de optimizar la producción de astaxantina(9).

Por otra parte, las cepas de microalgas que se usan para fines comerciales o de investigación normalmente se obtienen de colecciones de cultivos establecidos. Sin embargo, cuando se busca la producción de un metabolito de interés a partir de un género específico de microalga en una determinada localidad geográfica, resulta dificultosa la obtención de la misma cepa utilizada en las investigaciones. Por tanto, es importante continuar aislando especies de microalgas nativas de poblaciones naturales locales ya que estas se encuentran más adaptadas a las condiciones ambientales dominantes en cada tipo de ambiente(10).



Se han reportado numerosas metodologías para el cultivo, producción, extracción y análisis de astaxantina, pero a pesar de que algunas investigaciones coinciden en algunos parámetros, resulta problemática la elección de una metodología cuando se desea producir un metabolito a partir de una cepa ya que existe gran variabilidad entre los métodos, y más aún cuando cada cepa presenta comportamientos ligeramente distintos frente a cada tratamiento(2).

Además, actualmente en la región de Arequipa, se presume que los productos comerciales que ofrecen astaxantina como principal componente bioactivo, presentan baja concentración de este componente ya que la biomasa seca de *Haematococcus* utilizada es de una coloración rojiza de muy baja intensidad cuando se compara con ilustraciones del polvo seco de *Haematococcus* que se encuentran en sitios web de empresas que producen astaxantina(11).

Es por ello que en el presente trabajo de investigación se busca determinar las condiciones más eficientes para el cultivo, producción, extracción y análisis de astaxantina a partir de una cepa del género *Haematococcus sp*, dichas condiciones posiblemente permitan mejorar la producción y concentración de Astaxantina en la biomasa microalgal en cultivos a nivel de laboratorio y en cultivos de escala media que podrían ser reproducibles en cultivos de mayor escala.

Los resultados de esta investigación podrían generar transferencia tecnológica para la comunidad científica y empresas productoras; además al mejorar la producción de astaxantina se podría promover el consumo de antioxidantes naturales y disminuir la incidencia de enfermedades causadas por estrés oxidativo y por ende se mejorará las condiciones de vida de la población en general.

## RESUMEN

Las microalgas poseen la capacidad de sintetizar metabolitos de alto valor e interés comercial para diversas industrias. Las microalgas del género *Haematococcus* *sp* son estudiadas por su capacidad de acumular altos niveles de astaxantina comparado con otras fuentes naturales. Astaxantina es un pigmento carotenoide de interés ya que presenta una alta actividad antioxidante que permite la eliminación de radicales libres, dicha actividad es superior a la actividad de otros antioxidantes.

En este trabajo de investigación se logró aislar una cepa del género *Haematococcus*, se identificó por su morfología celular y se identificó molecularmente como una microalga del género *Haematococcus* y de la especie *lacustris*. Seguidamente, se determinaron las condiciones de cultivo más adecuadas para la producción de biomasa vegetativa de la cepa aislada, la cual alcanzó una densidad celular máxima de  $1.48 \times 10^5$  células/mL en cultivo autotrófico BBM con pH de 7- 7.8, temperatura entre 20 – 21 °C, fotoperiodo 12h luz: 12 h oscuridad y aireación continua en cultivos de 7L.

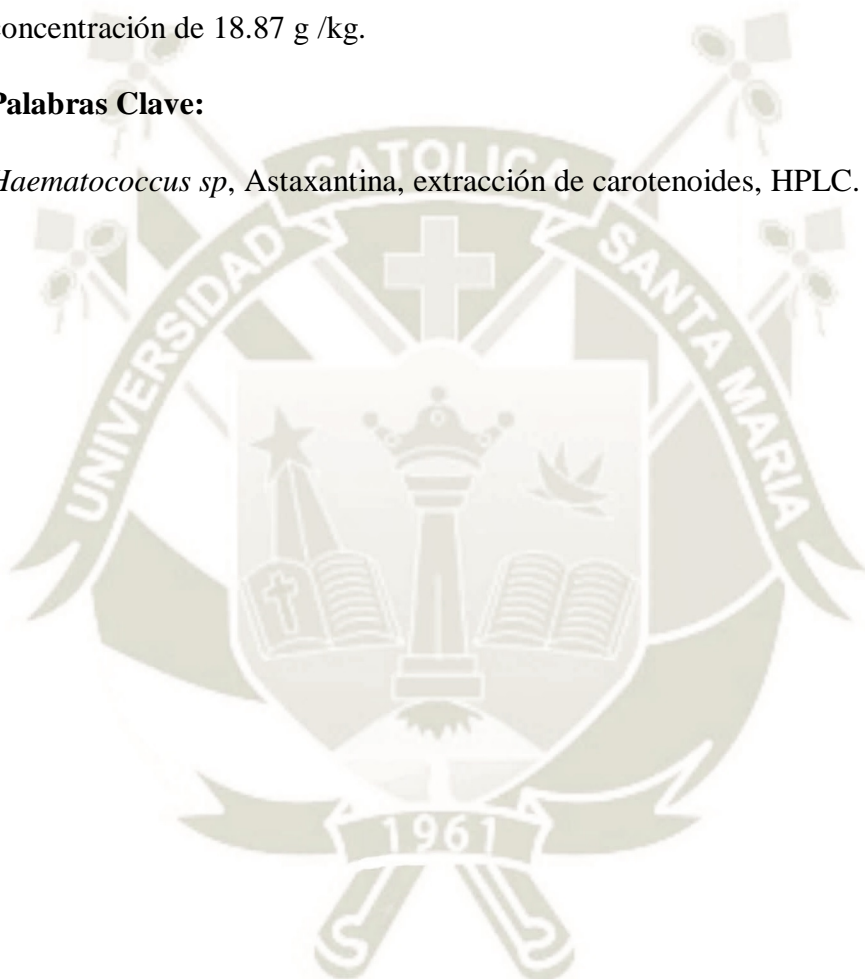
Además, se determinó que la inducción del estrés en los cultivos con acetato de sodio 0.5% e iluminación continua en cultivos de bajos volúmenes y exposición a luz solar en cultivos de mayor volumen son las condiciones de cultivo más adecuadas para la producción de astaxantina en *Haematococcus* *sp*; bajo las cuales se logró una productividad volumétrica promedio  $2.538 \text{ g/L}^{-1}$  de biomasa húmeda y  $0.3098 \text{ g/L}^{-1}$  de biomasa seca. Así mismo, se determinó que la metodología de extracción con HCl 4N, acetona y asistida por ultrasonido es la más eficiente para la extracción de astaxantina.



Finalmente, se desarrolló y validó un método para determinación de ésteres de astaxantina por cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC), la cual presenta una linealidad con  $R^2 = .9969$ , coeficientes de variación en la precisión aceptados por la AOAC, exactitud con una recuperación de 86.70 %, un LDD de  $1.71 \text{ mg/L}^{-1}$  y un LDQ de  $2.48 \text{ mg/L}^{-1}$ . El cromatograma de ésteres de astaxantina muestra tres picos cuantificables con tiempo de retención a 8.2, 11.1 y 15.9 minutos. La cuantificación de astaxantina en biomasa seca de *Haematococcus sp* tiene una concentración de 18.87 g /kg.

**Palabras Clave:**

*Haematococcus sp*, Astaxantina, extracción de carotenoides, HPLC.



## ABSTRACT

Microalgae have the ability to synthesize metabolites of high value and commercial interest for various industries. The microalgae of the genus *Haematococcus* are studied for their capacity to accumulate high levels of astaxanthin compared to other natural sources. Astaxanthin is a carotenoid of interest that has a high antioxidant activity that allows the elimination of free radicals, this activity is superior to the activity of other antioxidants.

In this research work, a strain of the genus *Haematococcus* was isolated, identified by its cellular morphology and identified molecularly as microalgae of the genus *Haematococcus* and the species *lacustris*. Next, the most suitable culture conditions were determined for the production of vegetative biomass of the isolated strain, which has a maximum cell density of  $1.48 \times 10^5$  cells / mL in BBM autotrophic medium culture with a pH of 7- 7.8, temperature between 20 - 21 ° C, photoperiod 12h light: 12 h dark and continuous aeration in 7L cultures.

In addition, stress induction with 0.5% sodium acetate and continuous illumination in cultures and sunlight for cultures with larger volume were determined as the most suitable conditions for the production of astaxanthin in *ó sp*, achieving  $2,538 \text{ g/L}^{-1}$  of wet biomass and  $0.3098 \text{ g/L}^{-1}$  of dry biomass. Furthermore, it was determined that ultrasound-assisted extraction with HCl 4N and acetone was efficient for the extraction of astaxanthin.

Finally, a method for quantification of astaxanthin esters was validated with linearity of 0.9969 in the correlation coefficient ( $R^2$ ), precision with coefficients of variation accepted in the AOAC, accuracy with a recovery of 86.70%, an LDD of  $1.71 \text{ mg/L}^{-1}$  and an LDQ of  $2.48 \text{ mg/L}^{-1}$ . The chromatogram of astaxanthin esters shows three quantifiable peaks with retention time at 8.2, 11.1 and 15.9 minutes. The quantification of astaxanthin in dry biomass of *Haematococcus sp* has a concentration of  $18.87 \text{ g / kg}$ .

### Key Words:

*Haematococcus sp*, Astaxanthin, carotenoid extraction, HPLC.